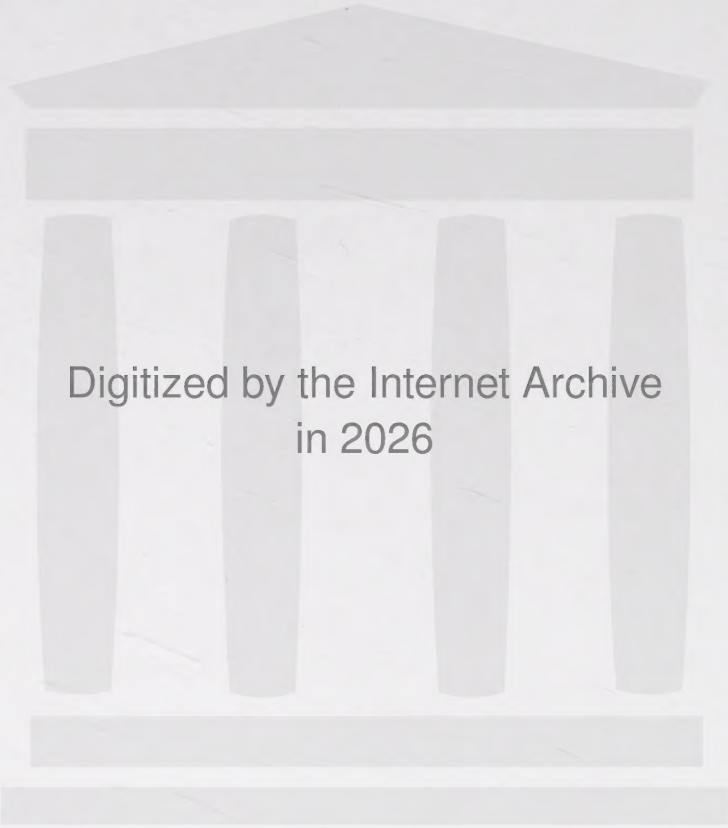


**Zur Isolierung des Inhibitors
aus Schweinepankreas und seiner
hemmaktiven Hydrolyisationsprodukte**

Hans-Jürgen Rießner

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0024

Aus dem Institut für Klinische Chemie und
Klinische Biochemie der Universität München

Vorstand: Prof.Dr.Dr.E.Werle

Zur Isolierung des Inhibitors aus Schweinepankreas
und seiner hemmaktiven Hydrolysationsprodukte

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans-Jürgen Rießner

aus
München

1973

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Werle
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. H. Fritz
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	9.4.1974



Einleitung:

Kunitz und Northrop isolierten 1936 aus Rinderpankreas einen "hauptsächlich aus Aminosäuren" bestehenden Trypsininhibitor. Dieses basische Polypeptid wurde bereits 7 Jahre früher als Kallikreinhemmstoff von Werle und Mitarbeitern entdeckt und ist heute bekannt als polyvalenter Proteinaseinhibitor aus Rinderorganen oder Kallikrein-Trypsininhibitor.

Dieser Inhibitor kommt außer im Pankreas auch in anderen Organen des Rindes vor, wie Parotis, Lunge, Milz, Leber, Samenblase. Er hemmt außer Trypsin und Kallikrein auch Plasmin und Chymotrypsin. Interessanterweise ist dieser Inhibitor gewebsständig und ^{wird} nicht sezerniert, tritt also auch nicht im Pankreassaft auf. Seine physiologische Funktion ist unbekannt.

Kazal und Mitarbeiter beschrieben 1948 die Isolierung eines weiteren Trypsininhibitors aus Rinderpankreasextrakten. Dieser Hemmstoff ist, wie wir heute wissen, einer homologen Reihe von Trypsininhibitoren zuzuordnen, den pankreas-sekretorischen Trypsininhibitoren, die in den Bauchspeicheldrüsen aller bislang untersuchten Säugetiere vorkommen. Sehr stark angereichert bzw. rein dargestellt wurden sie inzwischen aus Pankreas von Rind, ~~Schaf~~, Schwein, Hund, Katze und vom Menschen. Zum Teil lassen sich von derselben Spezies in ihrer Hemmwirkung identische Isoinhibitoren gewinnen, die sich nur geringfügig in der Bausteinzusammensetzung unterscheiden.

Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war es, die aus Schweinepankreas-extrakten isolierbaren Trypsin-Isoinhibitoren aufzutrennen. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob bei der Affinitätschromatographischen Isolierung des Trypsininhibitors aus Schweinepankreas die Isoinhibitoren in demselben Mengenverhältnis erhalten werden wie bei der klassischen Isolierung durch Ionenaustauschchromatographie, da es denkbar ist, daß beim Kontakt mit dem Trypsinharz eine enzymatische Modifizierung erfolgt, einige der Isoinhibitoren also Kunstprodukte darstellen.

I. Isolierung des Trypsinspezifischen Inhibitors aus
Schweinepankreas Über Säulen aus wasserunlöslichem,
aktivem Trypsinharz

Die Isolierung aus Schweinepankreasextrakten erfolgte bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$ über Säulen aus wasserunlöslichem, aktivem Trypsinharz nach dem Verfahren von Fritz und Mitarb.⁽¹⁵⁾, hergestellt nach bekanntem Verfahren aus Maleinsäureanhydrid-Äthylen-Kopolymer (EMA-21 oder EMA-31 der Fa. Monsanto, St. Louis, USA) und Trypsin (Trypure novo, Novo Industrie, Mainz). Um eine bessere Durchflußgeschwindigkeit der Säulen zu erreichen, wurde das Enzymharz mit dem gleichen Volumen mehrmals aufgeschlemmter und dekantierter, methylierter Cellulose (Cellex XF-1, Fa. Bio. Rad. Laboratories, Richmond, Calif.) vermischt. Die Organextrakte der in Pufferlösungen homogenisierten Bauchspeicheldrüsen wurden mit Äthanol als Enteiweißungsmittel von hochmolekularen Proteinen befreit. Die eiweißfreien Extrakte wurden mit NaOH auf pH 7,8 eingestellt und einen Tag bei 4°C aufbewahrt, worauf von erneut ausgefallenen Begleitstoffen abzentrifugiert und sie anschließend auf die Trypsinharzsäule aufgetragen wurden. Nach Auswaschen der Säulen mit dem 5 - 7 fachen Volumen an 0,1 M Triäthanolaminpuffer (0,1 M NaCl und 0,01 M CaCl_2), pH 7,8, erfolgte die Elution des Inhibitors mit 0,2 M KCl / HCl, pH 1,7 - 2. Das Eluat wurde neutralisiert, am Rotationsverdampfer bei 35°C eingengt und nach mehrmaligem Abtrennen der Salze endgültig über eine Sephadex G-15 Säule entsalzt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach dem bekannten Verfahren mit Hilfe des Substrats **N-DL-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid** (Fa. Fluka, Buchs) durch Messung der Extinktionsänderung bei 405 nm und 25°C unter Verwendung von Trypsin (EC 3.4.4.4. Fa. Serva Heidelberg bzw. Novo Industries, Mainz), wobei 1 Inhibitor-Millieinheit (mI) eine Verminderung

der Extinktionsänderung von $\Delta E = 0,00332$ pro min.
im 3 ml Ansatz bewirkt.

Fraktionierung des isolierten Trypsininhibitors an
einer DEAE - Sephadex A-50 medium Säule

Die Trennung wurde durch Ionenaustauschchromatographie an einer DEAE Sephadex A - 50 medium Säule (15 + 280 mm) bei 0 - 4°C und pH 8,0 in 0,01 M Trisacetat durchgeführt. Die Elution erfolgte durch Verdrängung mit einem linearen Gradienten, hergestellt aus 250 ml des Startpuffers und aus 250 ml 0,3 M KCl in 0,01 M Trisacetat pH 8,0 , der aus einem offenen Gefäß in eine gleichdimensionierte, offene Mischkammer kontinuierlich unter Rühren zum Startpuffer zugemischt wurde. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 27 ml/Std. Das Eluat wurde in einem Fraktionssammler bei einem Fraktionsvolumen von 1,5 ml aufgefangen. Die Bestimmung der Inhibitoraktivitäten in den Fraktionen ergab eine Auftrennung in hauptsächlich drei Komponenten, wobei es sich bei der Komponente I um den nativen Inhibitor handelt. Die Komponenten II und III stellen noch hemmaktive Hydrolisationsprodukte aus dem nativen Material dar.

Abb. 1

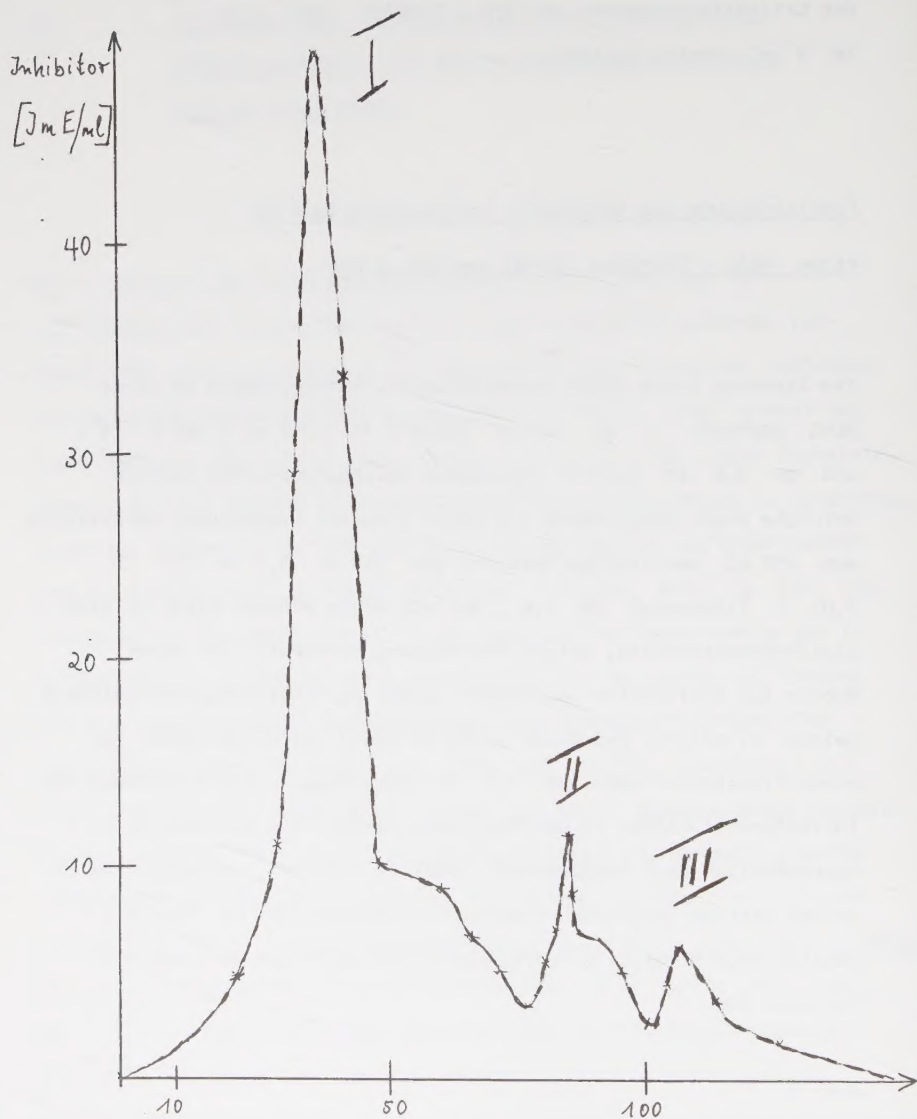


Abb: 1

II. Isolierung des Inhibitors aus Kieselguradsorbat

Bei der Isolierung des Trypsininhibitors über Trypsinharzsäulen wurde ein beträchtlicher Teil des nativen Materials während des Reinigungsprozesses in Abbauprodukte umgewandelt. Um den Inhibitor möglichst unverändert zu erhalten, wurde über eine Sephadex G - 50 Säule eluiert. Als Ausgangsmaterial diente ein Kieselguradsorbat, das die in den Organextrakten gelösten Stoffe, einschließlich des Inhibitors, in adsorbierter Form enthält. Die Gewinnung des Trypsininhibitors aus dem Kieselguradsorbat erfolgte in mehreren Arbeitsgängen, die aus der Elution des Trypsininhibitors, der Abtrennung von Fremd-eiweiß und Salzen an einer Sephadex G - 50 Säule und einer CM-Säule, der Auftrennung an einer DEAE-Säule und verschiedenen Entsalzungsschritten besteht.

II / 1 Elution des Inhibitors aus Kieselguradsorbat

Das gesamte zur Verfügung stehende Kieselguradsorbat wurde in drei Fraktionen zu je 1150 g unterteilt. Jede Fraktion wurde viermal mit je 2 l aqua dest. über eine Filtriernutsche, an die eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, eluiert. Nach jedem Arbeitsgang wurde der Adsorbatrückstand 30 min. in ca. 2 l aqua dest. gerührt und wieder von Neuem auf das Filter aufgegeben. Zur Kontrolle wurde die Inhibitoraktivität im Desorbat bestimmt. Das gesamte auf diese Weise gewonnene Desorbat wurde am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 3 l eingengt bei einer Temperatur von etwa 30°C und anschließend zentrifugiert. Es bildete sich ein Niederschlag, der mit 500 ml aqua dest. aufgeschlemmt und von Neuem zentrifugiert wurde. Dieser Überstand wurde dem übrigen Desorbat beigemengt.

Das Desorbat, dessen pH bei 5 lag, wurde nun mit 1 N Natronlauge unter Umrühren auf pH 7 eingestellt und nochmals zentrifugiert. Wieder bildete sich ein Niederschlag, der nochmals aufgeschwemmt, zentrifugiert und anschließend verworfen wurde.

II / 2

Reinigung des Desorbats an einer
Sephadex G 50 Säule

Das aus dem Kieselguradsorbat gewonnene, eingeeengte und zentrifugierte Desorbat wurde an einer Sephadex G - 50 Säule (105 + 10 cm), zu jeweils 100 ml, aufgetragen und mit einer 0,01 M Pyridinlösung mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 400 ml/Std fraktioniert. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 25 ml aufgefangen und ihre Inhibitoraktivität bestimmt. Die inhibitorhaltigen Fraktionen wurden mit Silbernitrat durch Entnahme kleiner Proben auf etwaigen Gehalt an Chlorid geprüft; die chloridfreien Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer auf ein möglichst kleines Volumen eingeeengt.

Abb. 2 Elutionsdiagramm

II / 3

Reinigung des Desorbats von
Fremdeiweiß an einer CM Säule

Auf die mit 0,005 M Ammoniumacetat äquilibrierte Säule (2,5 + 100 cm) wurde der trypsinspezifische Inhibitor aufgetragen und mit einer Geschwindigkeit von 8 ml/Std eluiert. Das Eluat lief zur Kontrolle über ein bei einer Wellenlänge von 280 nm messendes Photometer, wobei das Fremdeiweiß einen markanten Peak ergab. Nach Erscheinen des Peaks wurde der Puffer gewechselt und

emmaktivität

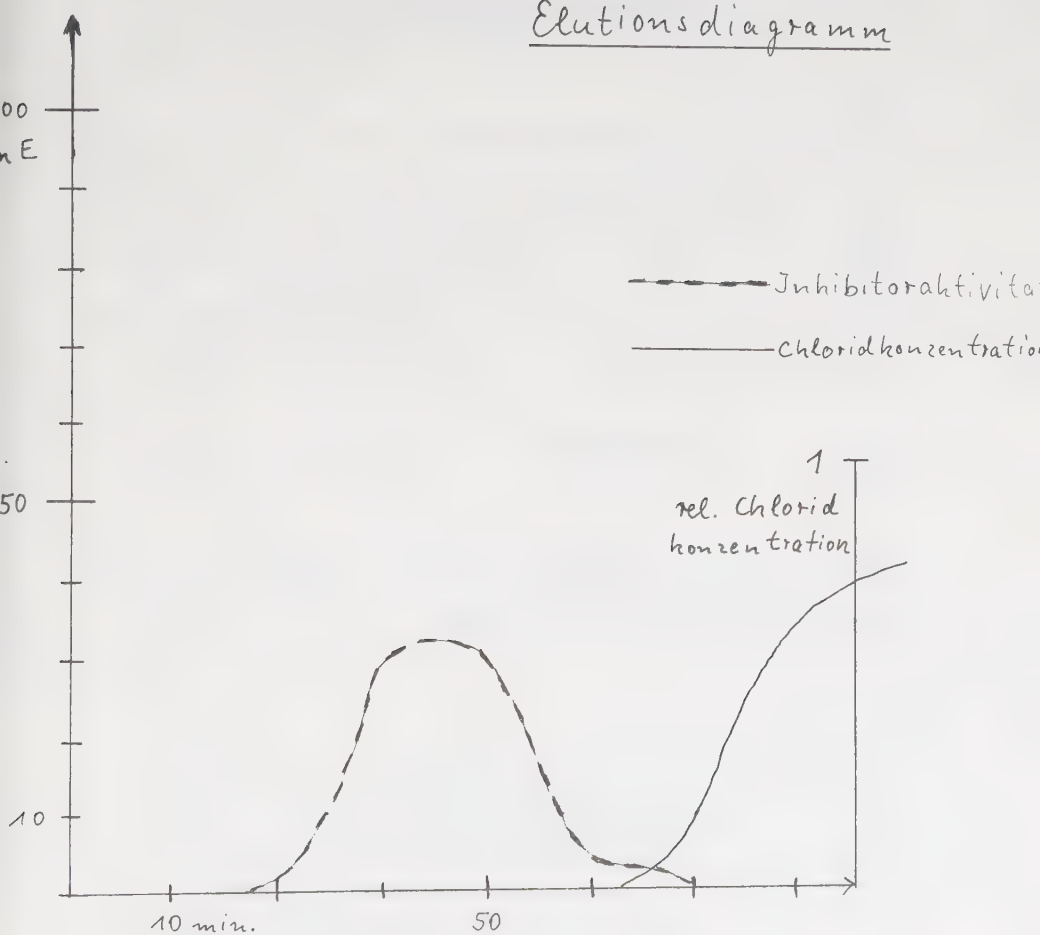
Elutionsdiagramm

Abb. 2

der Inhibitor mit 0,05 M Ammoniumacetat pH 5 ausgewaschen. Das Eluat wurde in 5 ml Fraktionen aufgefangen, die Hemmaktivität vermessen und die inhibitorhaltigen Fraktionen eingeeengt. Der Gehalt an Inhibitor verteilte sich in den einzelnen Fraktionen auf die in der Abbildung angegebene Weise.

Abb. 3 Inhibitorverteilung auf die Fraktionen

II / 4 Entsalzung an einer Biogel P-2 Säule

Das aus der CM-Säule stammende Material enthält neben dem Inhibitor auch Ammoniumacetat. Um dieses Salz vom Inhibitor zu trennen, wurde das Eluat aus der CM-Säule auf eine Biogel P-2 Säule aufgetragen und mit 0,01 M Pyridinlösung bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 8 ml/Std eluiert. Die optische Dichte des Eluats wurde mit Hilfe eines Photometers bei 280 nm kontinuierlich registriert.

Abb. 4 Elutionskurve

Nach der Entsalzung wurde die inhibitorhaltige Fraktion wieder auf ein möglichst kleines Volumen eingeeengt.

II / 5 Trennung des Materials an einer DEAE-50 Säule

Die weitere Auftrennung wurde durch Ionenaustauschchromatographie an einer DEAE A-50 medium Säule bei pH 8,0 in 0,01 M Trisacetat durchgeführt. Dazu wird DEAE-Sephadex A-50 in

Inhibitorverteilung und die Fraktion

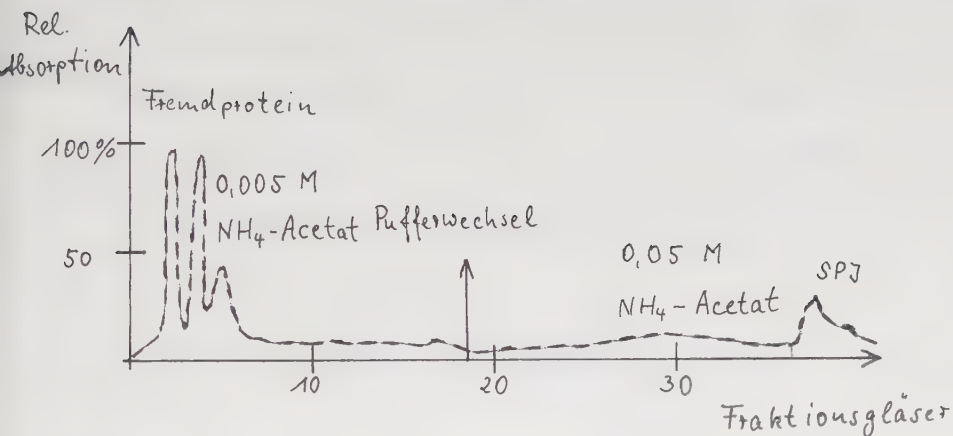


Abb: 3

Elutionskurve

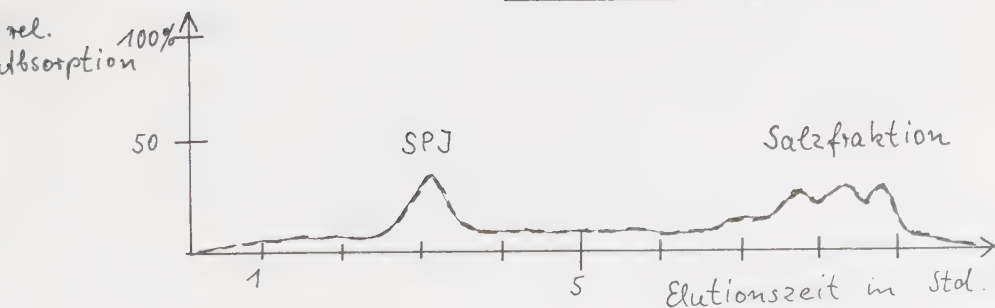


Abb: 4

0,01 M Trispuffer, pH 8,0, in eine Säule (4 + 90 cm) eingefüllt und äquilibriert. Die auf die Säule aufzutragende Substanz wird in einer kleinen Menge Trispuffer gelöst, auf pH 8,2 - 8,4 eingestellt und auf die Säule aufgetragen. Eluiert wird mit einem linearen Gradienten aus 2,5 l 0,01 M Trispuffer pH 8,0 und 2,5 l desselben Puffers plus 0,3 M KCl. Das Eluat der Säule wurde ständig mit einem Uvicord bei einer Wellenlänge von 280 nm vermessen. Die Absorptionsmessung des Eluats ergab folgende Kurve.

Abb. 5 Fraktionierung durch Ionenaustauschchromatographie

III / 1

Auftrennung des SPI
an einer DEAE Säule

Verwendet wurde DEAE - Sephadex in einer (4 + 90 cm) Säule, der mit 0,01 M Trispuffer pH 8,0 äquilibriert wurde. Die Substanz wurde in einer möglichst kleinen Menge Trispuffer gelöst und auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von KCl in Trispuffer, der auf in II/5 beschriebene Weise erzeugt wird. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 8 ml/Std. Bei diesem Verfahren konnten hauptsächlich zwei Fraktionen voneinander getrennt werden, wie aus der nachfolgenden Abbildung ersichtlich ist. Das Eluat wurde in Fraktionen von 2 ml auffangen und der Gehalt an hemmaktiver Substanz mit dem Bani - Test geprüft.

Abb. 6 Fraktionierung der III. Komponente

Fraktionierung durch

Jonenaustauschchromatographie

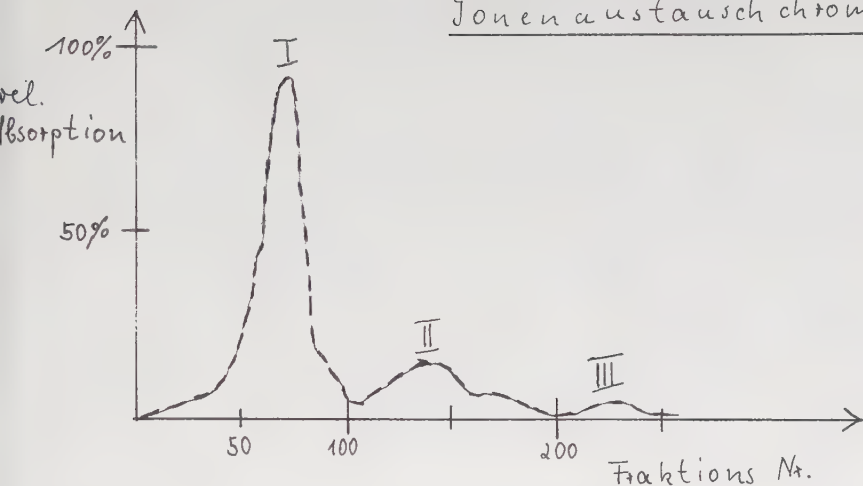


Abb: 5

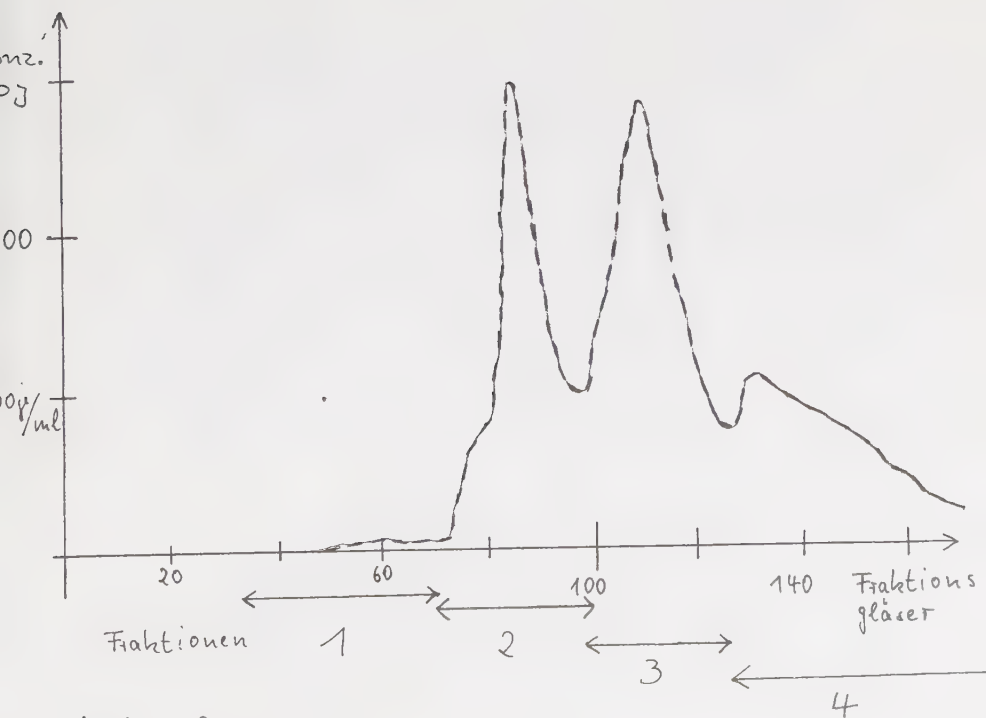


Abb: 6

Die III. Komponente trennt sich in vier neue Fraktionen auf, wobei der Hauptanteil auf die Fraktionen 2 und 3 entfällt. Die Fraktion 2 war in den Gläsern 76 - 98 enthalten. Sie wurde wie die übrigen Fraktionen auf ein möglichst kleines Volumen eingeeengt. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen zur Entsalzung auf eine Biogel P-2 Säule aufgetragen und mit einer 0,01 M Pyridinlösung eluiert. Die Entsalzungskurve entspricht der in Abb. 4 .

III / 2

Auftrennung an einer S E - Sephadex Säule

Nach Auftrennung der III. Komponente nach unterschiedlicher Basizität an der DEAE-Säule, können nun die daraus gewonnenen Fraktionen nach unterschiedlicher Azidität weiter aufgetrennt werden. Dies gelang an einer Säule (1,5 + 90 cm) mit S E - Sephadex C 25, die mit 0,05 M Ammoniumacetat äquilibriert und auf pH 6,1 eingestellt wurde. Die aus der DEAE - Säule stammenden Fraktionen wurden in möglichst wenig Ammoniumacetatpuffer gelöst und auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit einer Geschwindigkeit von 8 ml/Std . Substanzen mit geringerer Basizität im Molekül haften stärker am Harz, sie werden folglich zuletzt im Eluat erscheinen.

Zunächst wurde die 2. Fraktion aus der DEAE-Säule weiter aufgetrennt. Aus der folgenden Abbildung ist ersichtlich, daß diese Fraktion kein einheitliches Material darstellt. Zur Kontrolle wurde wiederum die Absorption mit einem Uvicord gemessen.

Abb. 7

Trennung der 2. Fraktion aus der
DEAE Säule an einer S E Säule

Die erhaltenen Substanzen aus der Auftrennung an der S E-Säule wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren an einer Biogel P-2 Säule entsalzt.

III / 3

Trennung der 3. Fraktion aus der
DEAE -Säule an einer S E -Säule

Die 3. Fraktion aus der DEAE - Säule wurde ebenfalls an einer S E-Säule weiter aufgetrennt. Wie aus der folgenden Abbildung ersichtlich, besteht auch sie nicht aus einer einheitlichen Substanz und läßt sich weiter auftrennen.

Der Schreiber des Uvicords wurde während der Elution beobachtet und jeder Peak getrennt in einem Glaskolben aufgefangen. Die Nummern in der Kurve zeigen die getrennt aufgefangenen Fraktionen des Eluats. Die Fraktionen aus der S E-Säule wurden einzeln an einer Biogel P 2-Säule entsalzt. Die auf diese Weise erhaltenen Fraktionen wurden an einem Massenspektrographen einer Aminosäuren-analyse unterzogen.

Abb. 8

Trennung der 3. Fraktion aus der
DEAE -Säule an einer S E -Säule

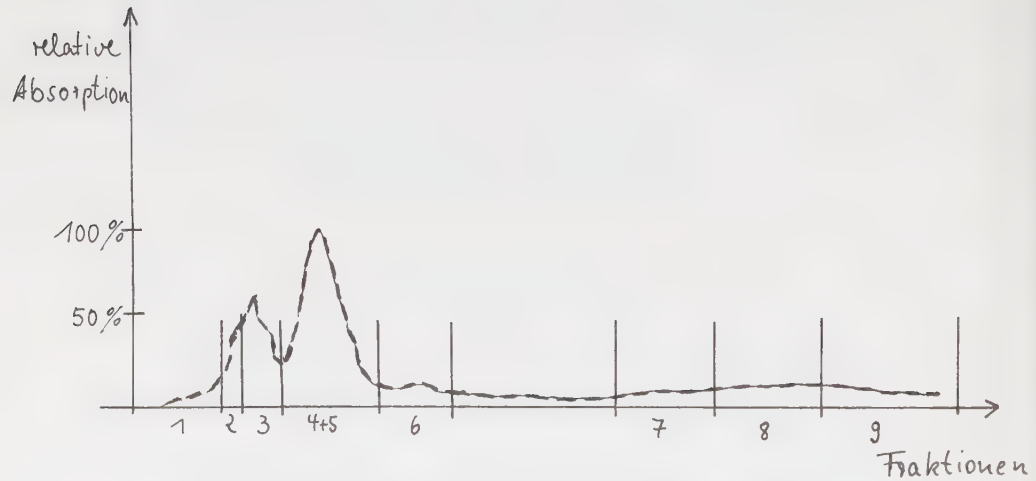


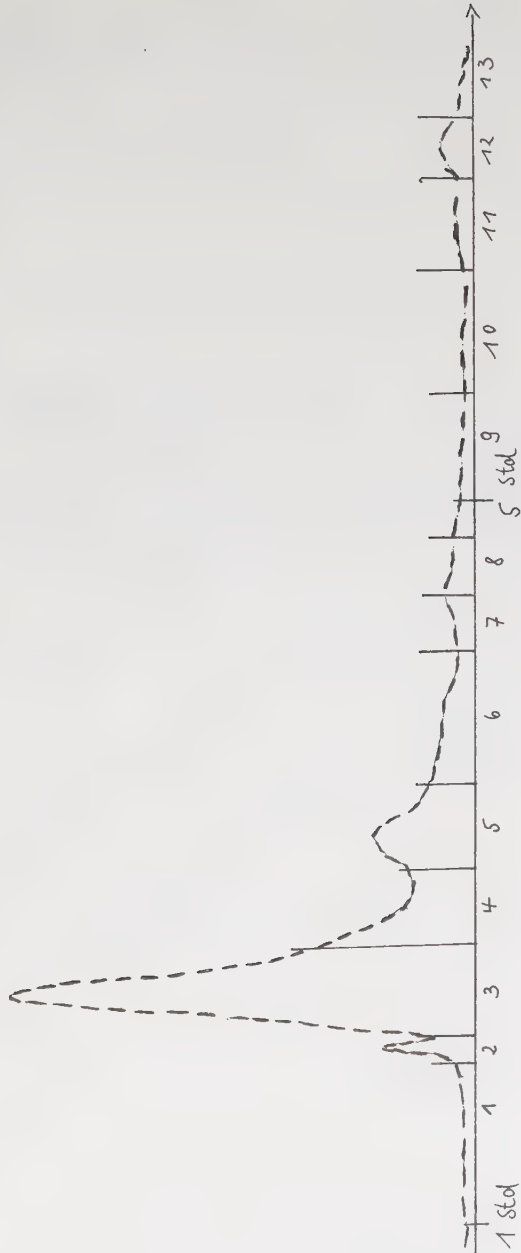
Abb: 7

Trennung der 2. Fraktion aus der DEAE
Säule an einer SE Säule

Absorption

100%

50%



Trennung der 3. Fraktion aus der DEAE Säule
an einer SE Säule

Abb: 8

Zusammenfassung

Zwei Verfahren zur Isolierung des Schweinepankreasinhibitors wurden angewandt.

Bei der Isolierung des Schweinepankreasinhibitors durch Ionenaustauschchromatographie an einer DEAE Säule bleibt der Inhibitor im Wesentlichen in nativem Zustand erhalten, während bei der Isolierung über eine wasserunlösliche Trypsinharzsäule drei inhibitorisch aktive Komponenten entstehen. Komponente III ließ sich durch Ionenaustauschchromatographie an der DEAE Säule in weitere vier Fraktionen auftrennen, wobei Fraktionen II und III die größte Hemmwirkung aufwiesen und sich an einer S E Sephadex Säule weiter auftrennen ließen.

1. H.Kraut, E.K. Frey, E.Werle, Z.Physiol.Chem. 192, 1 (1930)
2. H.Kraut, E.K.Frey, E.Werle und Schultz, Z. Physiol. Chem. 230, 259 (1934)
3. E.K.Frey, H.Kraut und E.Werle, Kallikrein-Padutin, Ferdinand Enke - Verlag, Stuttgart 1950
4. H.Fritz, M.Hutzel und E.Werle, Z. Physiol.Chem. 348, 950 (1967)
5. M.Kunitz und J.H.Northrop, J.gen. Physiol. 19, 991 (1936)
6. R.Vogel, I.Trautschold und E.Werle in G.Weizel und N.Zöllner, Natürliche Proteinaseinhibitoren, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1966
7. H.Haendle, H.Fritz, I.Trautschold und E.Werle, Z. Physiol.Chem. 343, 185 (1965)
8. H.Fritz, I.Trautschold, H.Haendle und E.Werle in Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications of Proteinase Inhibitors, Conference of New-York City, Sept. 12 - 13, 1966, Springer-Verlag, New-York, 1968
9. I.Trautschold, Habilitationsschrift, Mediz. Fak.d. Universität München 1965.
10. I.Trautschold, E.Werle, H.Haendle und H.Sebening, Z. Physiol. Chem. 332, 328 (1963)
11. H.Fritz, I.Trautschold, G.Hartwich und E.Werle, Fed. Europ. Biochem. Soc. IInd Meeting, Wien, 1965
12. H.Fritz, F.Woitinas und E.Werle, Z.Physiol. Chem. 345, 168 (1966)
13. H.Fritz, H.Schult, M.Neudecker und E.Werle, Angew. Chem. 78, 775(1966)
Angew. Chem, intern. Edition 5, 735 (1966).
14. H.Fritz, G.Hartwich und E.Werle, Z.Physiol. Chem. 345, 150 (1966).
15. H.Fritz, Habilitationsschrift, Med.Fak.Univ.München (1968)
16. L.J.Greene, M.Rigbi, D.S.Fackre, J.Biol.Chem. 241, 5610 (1966)
17. L.J.Greene, J.J.Dicarlo, A.J.Sussmann und D.C.Bartelt
J.Biol.Chem. 243, 1804 (1968)

Hans - Jürgen Rießner

Lebenslauf

Am 5. August 1942 wurde ich, Hans-Jürgen Rießner, als Sohn des prakt. Arztes Dr.med.Ewald Rießner und seiner Ehefrau Katharina geb. Munkenast in Ulm an der Donau geboren.

Von 1949 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Pfaffenhofen an der Roth. 1955 wechselte ich zum Wittelsbacher Gymnasium in München über. Nach bestandenem Abitur immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilian-Universität in München.

Nach sechs Semestern bestand ich die ärztliche Vorprüfung und nach weiteren sechs klinischen Semestern legte ich im Dezember 1970 die ärztliche Prüfung ab.

Die Approbation als Arzt erhielt ich nach einjähriger Tätigkeit als Medizinalassistent am 17. Februar 1972.

